

食品添加物の同時投与が培養神経細胞に及ぼす 相乗効果についての一検討

永野 忠聖^{1*}、岩下 香織¹、鴨下 亜衣¹、辻 友美¹

食品添加物の安全性についての評価は一般的に単独でおこなわれることが多いため、Lau らは複数の食品添加物の組み合わせによる神経芽細胞腫への効果について検討をおこない、神経突起の成長阻害が2種類の食品添加物(ブリリアントブルー FCF と L- グルタミン酸、キノリンイエローとアスパルテーム)の同時投与により相乗されることを示した。本研究では、Lau らがおこなっていない2種類の組み合わせである、アスパルテームとブリリアントブルー FCF それぞれの単独投与と共投与を初代培養神経細胞に対しておこない、神経細胞への生存作用について検討をおこなった。また、食品添加物と注意欠陥・多動性障害(ADHD)との関連性がこれまでに指摘されており、ADHD において GABA 抑制伝達が減弱するとの報告もあることから、本研究では、GABA 抑制性神経細胞に対して免疫組織化学的手法を用いて検討をおこなった。ブリリアントブルー FCF を単独で 10nM、72 時間添加したとき、大脳皮質初代培養神経細胞の細胞数は有意に減少していた。また、ブリリアントブルー FCF 10nM、アスパルテーム 5μM の濃度で共投与した時に GABA 抑制神経細胞の割合が有意に減少していた。これらの結果は、高濃度のブリリアントブルー FCF が神経細胞に対して生育阻害に働き、また、高濃度のアスパルテームと組み合わせた時に、特に GABA 抑制細胞に対して阻害的に働くことを示唆する。

キーワード: 食品添加物、培養神経細胞、γ-アミノ酪酸(GABA)

はじめに

甘味料や保存料などの食品添加物が行動や学習効果について及ぼす影響については未だに議論の余地があり、Bateman らの研究によれば、着色料と保存料を除いた食品を摂取した時に、学習、多動性が改善することが示されたが¹⁾、一方、他の研究グループでは、食品添加物の摂取と学習および多動性への関連性は観察されなかったとしている²⁾。また、合成着色料も市販の食品において多く用いられているが、単独での摂取では過剰量の摂取ではない場合において問題がないとされる。食用色素に分類されるブリリアントブルー FCF については、その類縁体であるブリリアントブルー G が脊髄損

傷への治療効果が期待されるとして研究がおこなわれている³⁾。食品添加物の安全性についての検討は一般的に単独で行われることが多いため、Lau らは複数の食品添加物の組み合わせ(ブリリアントブルーと L- グルタミン酸、キノリンイエローとアスパルテーム)についてマウス神経芽細胞腫 NB2a に対する効果について検討をおこない、神経突起の成長阻害が2種類の食品添加物の投与により相乗されることを示した⁴⁾。そこで本研究では、本邦において食品添加物として認められているアスパルテームとブリリアントブルー FCF (青色 1 号)を同時に投与した時の初代培養神経細胞への効果について検討をおこなった。初代培養神経細胞の分化・成長の過程は生体内の健康状態をよく反映するた

¹ 新潟県立大学人間生活学部健康栄養学科

* 責任著者 連絡先:tnagano@unii.ac.jp

利益相反: なし

め、神経毒性や神経細胞の成長への影響を観察するために用いられる⁵⁾。培養神経細胞の中でも、今回は GABA 作動性神経細胞への作用について着目した。これまでに食品添加物と多動性との関連について研究をおこなった例は多くあり、また、ADHD（注意欠如・多動性障害）を患う小児において、大脳皮質一次運動野における GABA シグナル減少が観察されたことから⁶⁾、食品添加物の過剰摂取が GABA 作動性の抑制神経細胞に及ぼす影響が考えられるため、本研究を遂行した。食品添加物の投与濃度については、Lau らが算出した、体重 10kg の子どもが摂取し、消化した時の潜在的血漿濃度を参考にした⁴⁾。彼らの計算値を一日許容摂取量に換算すると、ブリリアントブルー FCF 12.5mg/kg_(体重) 摂取時は、潜在的な血漿濃度は 14nM となる。アスパルテームについては、40mg/kg_(体重) 摂取時、潜在的な血漿濃度は 6.8μM となる。本研究では添加物の培養液中濃度を、ブリリアントブルー FCF は最大 10nM、アスパルテームは最大 5μM にして検討した。仮想的に算出した潜在的な血漿濃度が脳内においてどれだけ反映されるかは不明である。

方法

1. ラット胎児初代培養神経細胞の調製

ドライアイスで麻酔した SD ラットより胎生 18 日の胎児を取り出し、氷冷した L-15 メディウムをいれた滅菌シャーレ中で脳軟膜を丁寧に剥ぎ、大脳皮質を取り分けた。以下の作業からクリーンベンチに移動し、L-15 メディウムで 2 回洗った。10% 牛血清入りダルベッコ改変イーグル培地を入れ、ピペット操作で機械的に細胞を分散した。分散した神経細胞を 10% 牛胎児血清入りダルベッコ改変イーグル培地に 200-400 毎平方ミリメートルの密度になるように希釈した。分散した大脳皮質神経細胞はあらかじめポリ-D-リジンでコートした滅菌プラスチックディッシュに播いた。CO₂ インキュベーターに入れ、1 時間後に再び、無血清 N2 培地（1 mM グルタミン、100 μg/ml トランスフェリン、5 μg/ml ウシ由来インスリン、16 μg/ml プトレシン、20 nM プロゲステロン、30nM 亜セレン酸ナトリウム、10mM

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid (HEPES: pH7.3)) にメディウム交換をおこなった。食品添加物は培養開始 1 日後に単回投与した。免疫組織化学的観察をおこなうために、培養 4 日目にパラホルムアルデヒドで固定し、試料とした。

2. 添加試薬

アスパルテーム（和光純薬）は最終濃度が 5μM、0.5μM、50nM になるように滅菌水に溶解して添加した。ブリリアントブルー FCF（和光純薬）については最終濃度が 10nM、1nM、0.1nM になるように滅菌水に溶解させ添加した。

3. 免疫組織化学

CO₂ インキュベーターから初代培養神経細胞を取り出し、リン酸緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄してから、4% パラホルムアルデヒド、0.5% グルタルアルデヒド、2% スクロースを含有する 0.15 M PBS で細胞を固定した。固定した細胞は免疫組織化学に供する前まで冷蔵庫内で PBS に入れ替え保管した。免疫染色の際、取り出した固定済の培養神経細胞はトリス緩衝液 (TBS) で 2 回洗浄をおこなった。ウサギ由来抗 GABA 抗体 (Calbiochem 社) を 3% 牛胎児血清、0.3% ウシ血清アルブミンを含む TBS に 1000 分の 1 の濃度に希釈し 4℃ で 1 昼夜反応させた。その後 3 回 TBS で 10 分ずつ洗浄し 1 次抗体と同じ TBS 液に Alexa488 ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体 (Sigma) を室温で 1 時間反応させた。そのあと 3 度 TBS で 10 分ずつ洗浄し、最後に顕微鏡用水性封入剤 (アクアテックス: メルク) を滴下し、乾燥させた。

4. 顕微鏡観察

観察には蛍光顕微鏡 (BX50: オリンパス) を用いた。抗 GABA 抗体により認識させた GABA 含有神経細胞を可視化するために用いた Alexa488 蛍光抗体を発光させるために蛍光励起フィルターには NIBA フィルターを使用した。蛍光色素陽性であった培養神経細胞について異なる視野をランダムに移動させ、0.188 平方ミリメートルの範囲を各条件において 10 箇

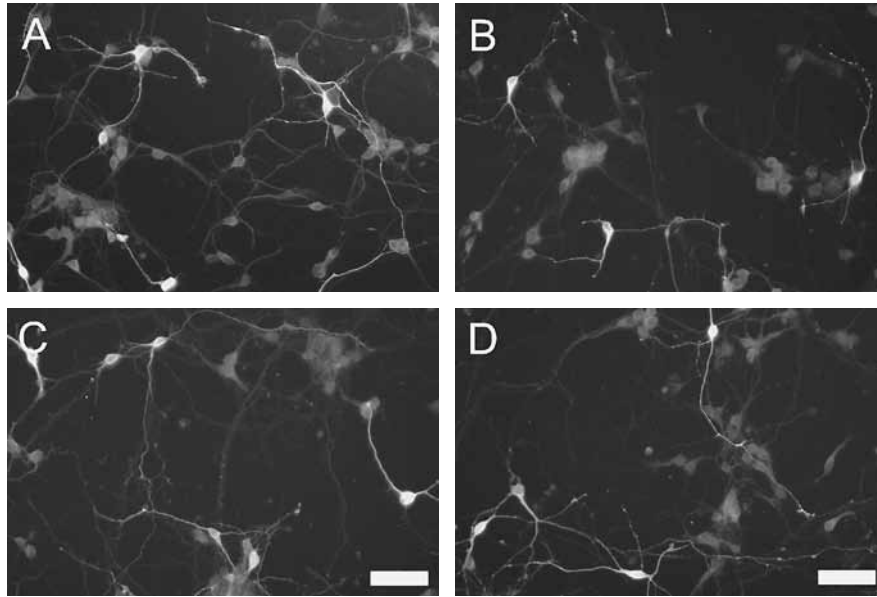


図.1 GABA 陽性細胞の蛍光画像.

(A-D) 培養 4 日目の培養神経細胞.

初代培養神経細胞を培養 4 日目に固定し、抗 GABA 抗体で免疫組織化学的染色をおこなった. 添加物なし (A). ブリリアントブルー FCF 10nM (B). アスパルテーム 5μM (C). ブリリアントブルー FCF 10nM+ アスパルテーム 5μM (D). スケールバー: 50 μm. (C, D).

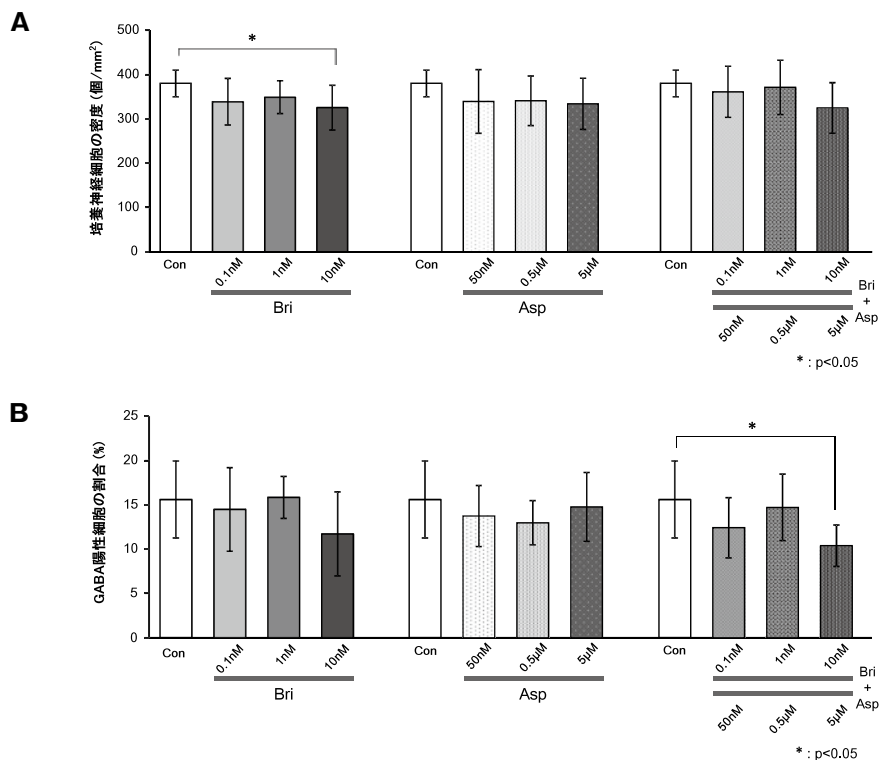


図.2 培養神経細胞の 4 日目の細胞密度および GABA 陽性細胞の割合.

(A) 細胞密度 1 平方ミリメートル当たりの培養神経細胞密度を示す. ブリリアントブルー FCF 単独の濃度別, アスパルテーム単独の濃度別, および共投与の濃度別データ. (各群 N=10). データは平均値 ± SD. (B) GABA 陽性細胞の割合を示す. 培養神経細胞の密度を算出した同視野において GABA 陽性細胞をカウントした. (各群 N=10). データは平均値 ± SD.

所をランダムにデジタルカメラ (D600; ニコン) で撮影した画像から GABA 陽性細胞数の計測をおこなった。同視野で GABA 陰性の細胞数をカウントし、1 平方ミリメートル当たりの培養神経細胞密度および GABA 陽性細胞数の割合を算出した。

5. 統計処理

データは平均値 \pm 標準偏差により示した。Dunnett 法を用いて検定をおこない、P 値が 0.05 未満のときに有意とみなした。

結果

培養神経細胞を計 4 日培養し、そのうち約 72 時間、ブリリアントブルー FCF、アスパルテーム、およびブリリアントブルー FCF+ アスパルテームを培地に添加して、GABA 抑制神経細胞を含む培養神経細胞の生存状態を比較検討した。各添加物については濃度を 3 点に取った (実験方法参照)。形態的には大きな差は観察されなかった (図 1A-D)。GABA 抑制神経細胞も含むトータルでの神経細胞数密度はコントロール群で 380.4 ± 30.2 個/mm² であるのに対して、単独投与群の中では、ブリリアントブルー FCF 10nM 単独投与により 325.6 ± 50.5 個/mm² となり、有意に神経細胞数が減少していた (図 2A)。アスパルテーム 5 μ M+ブリリアントブルー FCF 10nM の共投与では、 325.1 ± 56.8 個/mm² であり、減少傾向は見られたものの有意差はなかった (図 2A)。GABA 作動性神経細胞の割合については、アスパルテーム、およびブリリアントブルー FCF 両方の単独投与では、各濃度群において GABA 作動性神経細胞の有意な減少は観察されなかった (図 2B)。しかし、アスパルテーム 5 μ M+ブリリアントブルー FCF 10nM の共投与のときに、GABA 作動性神経細胞の割合が $10.4 \pm 2.3\%$ となり、コントロール群での割合である $15.6 \pm 4.3\%$ から有意に減少していた (図 2B)。

考察

Lau らはキノリンイエローとアスパルテームとの組み合わせ、およびブリリアントブルー FCF と L- グルタミン酸の組み合わせで共投与

して神経芽細胞腫への影響を観察した。彼らの結果によれば、ブリリアントブルー FCF と L- グルタミン酸それぞれ約 10nM、10 μ M の組み合わせで、単独投与のブリリアントブルー FCF 約 50nM 濃度、および単独投与 L- グルタミン酸約 50 μ M 濃度のそれぞれとほぼ同じことを示し、共投与による相乗的な効果が観察されたことを報告した⁴⁾。本研究における実験系においてはブリリアントブルー FCF 10nM 単独投与時に培養神経細胞数の減少が観察された。さらに、ブリリアントブルー FCF 10nM とアスパルテーム 5 μ M の共投与のときに、GABA 作動性神経細胞の割合が減少していた。しかし、ブリリアントブルー FCF とアスパルテームそれぞれの細胞毒性における作用機序については明らかではない。ブリリアントブルー FCF については、その類縁体であるブリリアントブルー G が ATP 感受性 P2X7 受容体の阻害効果を持つことが知られているが、P2X7 受容体遮断はむしろ過剰な神経興奮から神経を保護するが知られており⁷⁾、神経毒性を持つに至る機序については不明である。ブリリアントブルー FCF は、直接血液脳関門を通過するものの、アスパルテームについては分解産物であるフェニルアラニンがアミノ酸トランスポーターにより脳内へ運ばれる。過剰なフェニルアラニンがドーパミン、セロトニンそれぞれの合成に必要なチロシン、トリプトファン輸送阻害に働くことが示唆されている⁸⁾が、本研究で観察された細胞減少との関連は不明である。また、アスパルテームそのものの能動的輸送については明らかではない。ただ、アスパルテーム分解産物中にはメタノールも含まれるため⁸⁾、培養神経細胞に対する効果がアスパルテームそのものによるものか、もしくは代謝産物に起因するものかについてはよく分かっていないため、添加方法の妥当性などは今後の研究を待たねばならない。しかし、動物実験においては、成熟後には脳内に到達しないサイトカインのような大きな物質も幼弱期の動物では通過する⁹⁾。また、感染時の脳内においては、血液脳関門での物質透過性が亢進することから¹⁰⁾、抹消からの食品添加物が脳内に直接移行しないとの否定はできない。いずれにせよ、食生活においては多くの化学物質を同時に摂取

することになるため、安全性や生物活性の評価はこの点を考慮しなければならない。

謝辞

本研究を遂行するに当たり新潟大学脳研究所分子神経生物学分野 那波宏之教授より多大な支援をいただきました。深謝申し上げます。

文献

- 1) Bateman B, Warner JO, Stevenson J. et al. The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. Arch Dis Child. 2004 ; 89(6): 506–11.
- 2) Gross MD, Tofanelli RA, Snodgrass EW, et al. The effect of diets rich in and free from additives on the behavior of children with hyperkinetic and learning disorders. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 1987 ;26(1): 53–5.
- 3) Peng W, Cotrina ML, Nedergaard M. et al. Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(30):12489–93.
- 4) Lau K, McLean WG, Howard CV. et al. Synergistic interactions between commonly used food additives in a developmental neurotoxicity test. Toxicol Sci. 2006; 90(1): 178–87.
- 5) Brewer GJ, Torricelli JR, Joseph JA. et al. Age-related toxicity of amyloid-beta associated with increased pERK and pCREB in primary hippocampal neurons: reversal by blueberry extract. J Nutr Biochem. 2010; 21(10): 991–8.
- 6) Edden RA, Crocetti D, Mostofsky SH. et al. Reduced GABA Concentration in Attention-Deficit /Hyperactivity Disorder. Arch Gen Psychiatry. 2012; 69(7): 750–53.
- 7) Arbeloa J, Pérez-Samartín A, Matute C. et al. P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. Neurobiol Dis. 2012; 45(3): 954–61.
- 8) Rycerz K, Jaworska-Adamu JE. Effects of aspartame metabolites on astrocytes and neurons. Folia Neuropathol. 2013; 51(1):10–17.
- 9) Futamura T, Kakita A, Nawa H. et al. Neonatal perturbation of neurotrophic signaling results in abnormal sensorimotor gating and social interaction in adults: implication for epidermal growth factor in cognitive development. Mol Psychiatry. 2003; 8(1): 19–29.
- 10) Lossinsky AS, Shivers RR. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. Histochem J. 2004; 36(2): 535–64.

ABSTRACT

A study about the synergistic effects of food additives on cultured cortical neurons

Tadasato Nagano^{1*}, Kaori Iwashita¹, Ai Kamoshita¹, Tomomi Tsuji¹

Generally, the evaluation of food additives is often considered individually. Lau et al. examined the effects of combined food additives on neuroblastoma. And they found the synergistic neurite growth inhibition in combinations of two (Brilliant Blue and L-glutamic acid, Quinoline Yellow and aspartame). In this study, we tested the effect of combined food additives in combination with aspartame and Brilliant Blue FCF. Each of single-application and co-application was performed on cultured cortical neurons and they were subjected to the analysis of neurotoxic effect. Exposure to food additives during childhood has been implicated in the induction of behavioral and developmental disorders, such as attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Recent studies suggest that ADHD is characterized by a deficit in cortical inhibition. Therefore we focused the cellular effects to GABAergic neurons using an immunohistochemical method. When brilliant blue FCF was applied at 10nM for 72hours, the number of cells in cortical culture was decreased significantly. And furthermore, co-administration of Brilliant Blue FCF 10nM and 5μM aspartame reduced the rate of GABA-immunopositive neurons significantly. These results suggest that exposure to overdosed Brilliant Blue FCF acts on growth inhibition of cortical neurons, and when it is applied to cultured neurons in combination with high concentration of aspartame, GABAergic neurons are particularly affected.

¹ Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life Science, University of Niigata Prefecture

* Correspondence, tnagano@unii.ac.jp

Conflict of interest: None declared

Key Words: Food additives, cultured neuron, GABA (γ-amino aminobutyric acid)